

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：34417

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15577

研究課題名(和文) 新規がん組織培養法を用いた麻酔薬のがん組織表現型と遺伝子型への影響の検討

研究課題名(英文) Investigation of effects of anesthetics on phenotype and gene expression of cancer cells with CTOS method

研究代表者

岩井 鉄平 (Iwai, Teppai)

関西医科大学・医学部・助教

研究者番号：90440966

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：がん患者の治療としての手術を行う際に麻酔管理法の差異が患者予後にいかなる影響を与えるかという問題は、古くから外科医・麻酔科医の研究対象となってきた。しかし、従来の研究手法は単離されて単層培養された細胞を対象としたものであったので生体内に存在するがん組織への影響を研究する目的には不十分であった。

本研究で、樹立細胞株に加えて新規がん組織培養法(CTOS法)で取得した細胞を用いて増殖能・細胞死・エネルギー代謝モード・浸潤能などのがん組織の表現型への影響に加えて、RNA-Seq法を用いた遺伝子発現の網羅的な解析やエピジェネティック変化への麻酔薬の影響を主に揮発性吸入麻酔薬を用いて検討した。

研究成果の概要(英文)：Growing evidence indicates that perioperative factors, including choice of anesthetic, affect cancer recurrence after surgery although little is known about the effect of anesthetics on cancer cells themselves. Certain anesthetics are known to affect phenotypes of cells derived from cancer. In this study, we used cells established from cancer tissue and the primary culture cells from the cancer tissue-originated spheroid (CTOS) method.

Our results provide evidence that the anesthetics isoflurane and sevoflurane did not exert a pro-tumorigenic effect on human cancer cell lines and spheroid cells by CTOS. We present evidence that the anesthetics did not affect phenotypes of cells derived from cancer, cell signaling pathway involving in tumorigenesis nor gene expression patterns associated with a malignant phenotype.

研究分野：麻酔科学

キーワード：麻酔薬 がん細胞 悪性度 CTOS HIF-1 RNA-Seq

1. 研究開始当初の背景

麻酔科学は主に手術を受ける患者の急性期全身管理を指向して発達してきた学問領域である。今までは、麻酔薬の生体への作用は一過性あり、しかも可逆的であるとの暗黙の了解も存在してきた。その意味で、麻酔後の患者の長期予後についての深い考察が不十分であった。

このような状況で「麻酔」ががん患者の手術予後にいかなる影響を与えるかという問題の解決は麻酔科学上の大きな課題の一つとなってきた。つまり麻酔管理と長期予後の関連の追究である。近年、麻酔薬（吸入麻酔薬か静脈麻酔薬か）や麻酔法（全身麻酔か区域麻酔か）の選択を含む麻酔管理法の差異ががん患者の予後へ与える影響についての興味が喚起されるようになり相当数の疫学研究の結果が報告されてきた。また麻酔薬の影響の検討のため、樹立細胞株を用いた基礎研究の報告も存在する。細胞増殖・悪性度の指標となる各種遺伝子発現を測定して周術期使用薬剤ががん細胞に直接どのような影響を及ぼすかという検討である。しかし従来の樹立細胞株を用いた検討は細胞株の樹立に伴う過程でがん組織がもつ性質が変化してしまっているという点また *in vitro* における表現型に力点を置きすぎて *in vivo* でのがんのがん組織としての振る舞いの検討への視点が欠損しているという致命的な問題点を抱えていてこのトピックスの本質的な解決には至っていなかった。

今回、新規がん組織培養法 (Cancer Tissue-Originated Spheroid; CTOS 法)を用いることで、従来の研究の欠点を克服して麻酔薬ががん組織に与える影響をきわめて臨床に近い形で再現するという研究計画を着想した。

2. 研究の目的

がん患者の治療としての手術を行う際に使用する麻酔薬の種類などを含む麻酔管理法の差異が、その後の患者予後にいかなる影響を与えるかという問題は、古くから外科医・麻酔科医の研究対象となってきた。しかし、従来の研究手法は単離されて単層培養された細胞を対象としたものであったので生体内に存在するがん組織への影響を研究する目的には不十分であった。申請者の一人である奥山らが開発した新規がん組織培養法 (Cancer Tissue-Originated Spheroid; CTOS 法) (PNAS (2011) vol.108, p6235) を援用してがん組織に特徴的な表現型 (hallmarks of cancer, (Cell (2011) vol.144, p646)) へ麻酔薬が直接与える影響を細胞生物学的、分子生物学的さらに遺伝学的に追究することが本研究の目的である。

この目的の達成のため、樹立されている CTOS を *in vivo* (xenograft モデル), *ex vivo* (試験管内スフェロイド培養), *in vitro* (試験管内単細胞培養) 条件下で麻酔薬処理を施して細胞生物学的、分子生物学的に CTOS の表現型と遺伝子発現・型への影響の検討を遂行する。

3. 研究の方法

(1) 実験系の確立

in vitro・*ex vivo* 実験系

in vitro 実験系とは、酵素処理を CTOS に施し単細胞化したものを培養に供して行う実験系であり、*ex vivo* 実験系とは CTOS をスフェロイドのまま培養して行う実験系である。

In vivo 実験系

in vivo 実験系とは xenograft (異種移植) モデルである。CTOS を NOD/SCID マウスの皮下に移植してその後にマウス自体に麻酔薬を投与して一定時間後取り出して様々な検討を行う実験系である。

CTOS の調製

CTOS は患者由来手術切除標本から樹立され継代を行っているラインを利用する。このうち大腸癌・肺癌由来のすくなくとも三種類づつの独立した CTOS を解析の対象とする。培養法はすでに報告している方法に従う (Proc Natl Acad Sci U S A 108 (2011) 6235-6240)。

(2) 具体的な検討方法

がん組織の表現型への影響

-1 増殖能

in vitro 系では生細胞中のミトコンドリアの脱水素酵素活性をベースにした MTT アッセイの変法 WST 法を用いて増殖能と生存を検討する。*ex vivo* での増殖は、顕微鏡で長軸と短軸を測定した指数によるものと WST 法を用いる。*in vivo* では、移植片の大きさを測定して増殖の指標とする。

-2 エネルギー代謝モード

CTOS の代謝状況を酸素消費速度 (oxygen consumption rates, OCR) と細胞外酸性化速度 (extracellular acidification rate, ECAR) を測定することにより推定して麻酔薬処理による影響を検討する。この解析には、米国 Seahorse Bioscience 社の細胞外フラックスアナライザーを用いるがこの機器は申請者らが関西医科大学で使用可能な状況である。

加えてがん細胞に特徴的なワールブルグ効果 (悪性腫瘍の腫瘍細胞内で、嫌気環境のみならず好気環境でも、解糖系に偏ったブドウ糖代謝が観察される現象) に中心的な役割を果たす hypoxia-inducible factor 1 の活性化状況を検討する。

-3 細胞膜分子発現

E-cadherin を中心とした細胞接着分子,マトリックスメタロプロテアーゼ (MMP-2,9 など)の発現を組織染色法と Western blot 法で検討する。

-4 細胞死(アポトーシス)

フローサイトメーターを用いて蛍光標識した annexin-V との結合で初期アポトーシスを検出を行い、同時に propidium iodide を用いて後期アポトーシスまたはネクローシスの検出を行う。

Caspase3 活性化は酵素活性を化学的に測定するキットと Western blot を用いて行う。アポトーシスに伴う poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) 分子の切断の有無は Western blot を用いて行う。

-5 細胞内シグナル分子活性

細胞増殖に重要な役割を果たすリン酸化酵素 phosphoinositide 3-kinase(PI3K), protein kinase B (AKT), extracellular signal-regulated kinase (ERK)の活性化状況を検討する。リン酸化型を見分ける抗体を用いた Western blot と酵素活性を直接検討する測定キットを用いて行う。

がん組織の遺伝子型への影響

-1 RNA-Seq 法を用いた遺伝子発現の網羅的な解析

-2 エピジェネティック状態への影響の解析

を細胞生物学,分子生物学的手法を用いて検討する

4. 研究成果

(1)CTOS を用いた検討

CTOS は患者由来手術切除標本から樹立され継代を行っているラインをした培養を開始した。

がん組織の表現型への影響

増殖能、代謝モード、細胞膜分子発、細胞死(アポトーシス)、細胞内シグナル分子活性などがん細胞の表現型をアッセイする実験系を確立した。

(2)樹立細胞株を用いた検討

CTOS と並行してがん組織由来の樹立細胞株を用いて増殖能、代謝モード、細胞膜分子発、細胞死(アポトーシス)、細胞内シグナル分子活性などがん細胞の表現型をアッセイする実験系を確立し、RNA-Seq 法を用いて揮発性吸入麻酔薬セボフルランのがん細胞の遺伝子発現に与える影響を網羅的に解析した。

樹立細胞株を用いた検討-CTOS と並行してが

ん組織由来の樹立細胞株を用いて増殖能、代謝モード、細胞膜分子発、細胞死(アポトーシス)、細胞内シグナル分子活性などがん細胞の表現型をアッセイする実験系を確立した。イソフルラン・セボフルラン処理は上記のがん細胞特有な表現型の発現に大きな影響を及ぼさなかった。特に転写因子 HIF-1 の活性化また HIF-1 の支配遺伝子の発現に有意の変化は認められなかった。

RNA-Seq 法を用いて揮発性吸入麻酔薬セボフルランの遺伝子発現への影響を検討した。セボフルランはごく少数の遺伝子の mRNA の発現に影響を与えたががん細胞の表現型と深く関連する遺伝子の発現変化は観察できなかった。

CTOS を用いた検討-CTOS は患者由来手術切除標本から樹立され継代を行っているラインをした培養を開始した。細胞株を用いた検討と平行して、RNA-Seq 法を用いて揮発性吸入麻酔薬セボフルランの遺伝子発現への影響を検討した。セボフルランはごく少数の遺伝子の mRNA の発現に影響を与えたががん細胞の表現型と深く関連する遺伝子の発現変化は観察できなかった。

以上の研究成果は現在公刊へ向けての作業に着手したところである。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 10 件)

Okamoto A, Sumi C, Tanaka M, Kusunoki M, Iwai T, Nishi K, Matsuo Y, Harada H, Takenaga K, Bono H, Hirota K
HIF-1-mediated suppression of mitochondria electron transport chain function confers resistance to lidocaine-induced cell death. Sci Rep (In Press)(査読あり)

Daijo H, Hoshino Y, Kai S, Suzuki K, Nishi K, Matsuo Y, Harada H, Hirota K:
Cigarette smoke reversibly activates hypoxia-inducible factor 1 in a reactive oxygen species-dependent manner. Sci Rep 2016, 6:34424. 10.1038/srep34424 (査読あり)

Okamoto A, Tanaka M, Sumi C, Oku K, Kusunoki M, Nishi K, Matsuo Y, Takenaga K, Shingu K, Hirota K: The antioxidant N-acetyl cysteine suppresses lidocaine-induced intracellular reactive oxygen species production and cell death in neuronal SH-SY5Y cells. BMC Anesthesiol 2016, 16:104. DOI:10.1186/s12871-016-0273-3 (査読あり)

Yamaguchi R, Harada H, Hirota K: VHL-deficient renal cancer cells gain resistance to mitochondria-activating apoptosis inducers by activating AKT through the IGF1R-PI3K pathway. *Tumour Biol* 2016. 37: 13295-13306 DOI:10.1007/s13277-016-5260-2 (査読あり)

Sato Y, Tateno H, Adachi J, Okuyama H, Endo H, Tomonaga T, Inoue M. Generation of a monoclonal antibody recognizing the CEACAM glycan structure and inhibiting adhesion using cancer tissue-originated spheroid as an antigen. *Sci Rep*. 2016;6:24823. DOI: 10.1038/srep24823. (査読あり)

Okuyama H, Kondo J, Sato Y, Endo H, Nakajima A, Piulats JM, Tomita Y, Fujiwara T, Itoh Y, Mizoguchi A, Ohue M, Inoue M. Dynamic Change of Polarity in Primary Cultured Spheroids of Human Colorectal Adenocarcinoma and Its Role in Metastasis. *Am J Pathol*. 2016 186:899-911. DOI: 10.1016/j.ajpath.2015.12.011. (査読あり)

Kiyohara Y, Yoshino K, Kubota S, Okuyama H, Endo H, Ueda Y, Kimura T, Kimura T, Kamiura S, Inoue M. Drug screening and grouping by sensitivity with a panel of primary cultured cancer spheroids derived from endometrial cancer. *Cancer Sci*. 2016 107 :452-60. DOI: 10.1111/cas.12898. (査読あり)

甲斐 慎一, 広田 喜一: 硫化水素はミトコンドリア依存的に低酸素誘導性遺伝子応答を調節する. *ICUとCCU* 2016, 40:549-554. (査読なし)

松尾 禎之, 広田 喜一: 「酸素はいつも足りていない」の生物学の建設 - 2016年度アルバート・ラスカー基礎医学研究賞の発表に寄せて. *Life Support and Anesthesia vol24* 2016 194-196 (査読なし)

広田 喜一: Oxygen, Hypoxia & Beyond -2016年アルバート・ラスカー基礎医学賞に寄せて. *医学のあゆみ* 2016, 259:961-963. (査読なし)

〔学会発表〕(計 5件)

膜結合型酸化還元酵素 TMX1 のレドックス状態を指標とした小胞体ストレスのモニタリング

松尾禎之, 広田喜一

第 39 回日本分子生物学会年会 2016/11/30
パシフィコ横浜 横浜市

transmitochondrial cybrids 細胞を用いたプロポフォル細胞毒性の検討-プロポフォル注入症候群の病態生理学

広田 喜一, 角 千里, 楠 宗矩, 岡本 明久, 田中 宏昌, 西 憲一郎, 松尾 禎之
第 23 回日本静脈麻酔学会 2016/11/19 コラッセ福島 福島市

膜結合型酸化還元酵素 TMX1 のレドックス状態を指標とした小胞体ストレスのモニタリング

松尾禎之, 広田喜一

第 14 回がんとハイポキシア研究会
2016/11/5 岐阜グランドホテル 岐阜市

2016 年アルバート・ラスカー基礎医学賞を記念して

広田喜一

第 14 回がんとハイポキシア研究会 2016
11/5 岐阜グランドホテル 岐阜市

揮発性吸入麻酔薬は転写因子 HIF-1 依存的に膵 細胞のグルコース刺激誘導性インスリン分泌を阻害する

鈴木堅悟, 広田喜一, 甲斐慎一, 西憲一郎
第 63 回日本麻酔科学会学術集会 2016/5/27
福岡国際会議場・マリンメッセ福岡 福岡

〔図書〕(計 1件)

広田 喜一: 日本医事新報社, 癌と臨床栄養 2 版 編集 丸山 道生 分担; 癌細胞のアミノ酸・蛋白質代謝と栄養. 2016 (12-16 ページ)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)
該当無し

取得状況(計 0件)
該当無し

〔その他〕

ホームページ等

<http://hypoxia.jp/hss/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

岩井 鉄平(IWAI, Teppei)

関西医科大学・医学部・助教

研究者番号:90440966

(2)研究分担者

広田 喜一(HIROTA, Kiichi)

関西医科大学・医学部・学長特任教授

研究者番号:00283606

奥山 裕照(OKUYAMA, Hiroaki)

地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪府

立成人病センター(研究所)・研究員
研究者番号：50432373

(3)連携研究者
該当無し

(4)研究協力者
該当無し